

## 論文の内容の要旨

論文題目

医薬品探索系としてのカイコの利用

氏名

堀江 亮

### <序論>

これまでの医薬品候補化合物の探索においては、試験管内での生理活性を指標とした探索の後に、マウスなどの哺乳類モデル動物を用いて治療効果を検討する方法がとられてきた。しかしながら、試験管内で活性を示す候補化合物のほとんどは体内動態や毒性の問題があるために治療効果を示さない。よって、治療効果を指標にした評価必要であるが、多数の哺乳類を犠牲にすることに対して、コストばかりでなく動物愛護の観点から問題があるとされている。この点を解決するためには、無脊椎動物による評価系の確立が有効であると考えられ、線虫やショウジョウバエの利用が提案されている。しかしながら、これらのモデル動物は個体のサイズが小さく定量的な化合物の投与が難しい。そこで、私が所属する研究グループでは医薬品の開発において、哺乳類での評価の前にカイコを用いた評価を行うことを提案してきた。カイコは比較的大型の昆虫であることから、血液内及び腸管内への正確な量の試料の注射や、血液の採取が容易である。さらに、薬物動態に関与する腸管などの臓器を取り出して試験管内での評価系を構築することも可能である。これまでに当研究室において、カイコ感染症モデルや糖尿病モデルなどの病態モデルが確立されてきた。また、感染症モデル用いた治療効果を指標としたスクリーニングにより、マウス感染モデルにおいても治療効果を示す新規抗生物質カイコシンの発見に成功している。

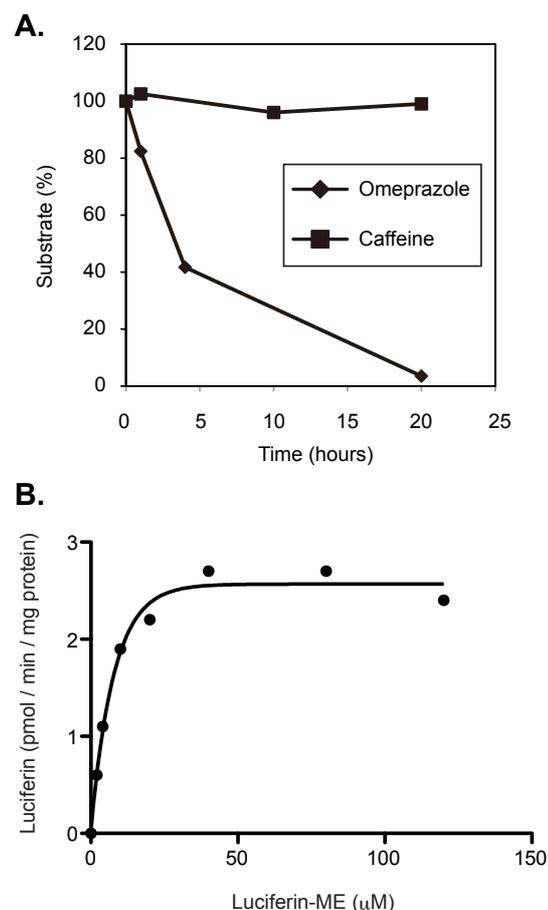
カイコが医薬品の評価系として有用であるかを明らかにするためには、薬物の治療効果を反映する体内動態を評価することが必要である。この考えのもと、私はカイコにおける薬物動態について研究を行ってきた。薬物動態に大きく影響を与える要因として代謝が挙げられるが、

カイコを含めた無脊椎動物における薬物代謝について系統的に検討した研究例は無い。本研究ではまず、薬物の代謝において重要な役割を果たすシトクローム P450 による反応について解析を行った。さらに、ヒトとカイコの代謝反応の差異を埋める方法としてヒトシトクローム P450 トランスジェニックカイコの作出が有効か否かについて検討を行った。また、私はカイコの血液中で安定な化合物は哺乳類の血液中でも安定であると予想し、それを利用した良好な体内動態を示す化合物の探索方法の確立を試みた。

## <方法と結果>

### カイコにおけるシトクローム P450 反応

私はシトクローム P450 代謝反応のモデル薬物として汎用される 7-ethoxycoumarin がカイコ体内で脱エチル化され、グルコース抱合を受けた後に排泄されることを明らかにしている(3)。さらに私は、カイコでは腸管において 7-ethoxycoumarin が脱エチル化されることを報告している。カイコを薬物の治療効果評価系として用いるうえで、哺乳類とシトクローム P450 代謝反応を比較することは重要である。そこで、哺乳類でシトクローム P450 により代謝される化合物がカイコにおいても代謝を受けるか検討した。カイコ摘出腸管を用いた *in vitro* での器官培養系においてカフェインを除く 13 の基質が代謝を受けた(Figure 1A)。さらに、これらの基質の中でシトクローム P450 によって代謝を受けると発光する化合物である Luciferin-ME はカイコ腸管ミクロソーム画分を用いた *in vitro* 再構成



系においても代謝を受けた(Figure 1B)。以上の Figure 1 カイコ腸管におけるシトクロームP450の代謝反応結果はカイコにも哺乳類と同様に複数種のシトクローム P450 による薬物の代謝系が存在することを示唆している。

### ヒトシトクローム P450 トランスジェニックカイコの作出

カイコを哺乳類における評価の前段階のスクリーニング系として用いる上で、ヒト型代謝酵素を有するカイコの作出は有用であると考えられる。上で述べたように、カイコにおいては哺乳類とは異なり、カフェインの代謝が見られない。そこで私は、カフェインを代謝するヒトのシトクローム P450 1A2 の遺伝子を導入したトランスジェニックカイコを作出し、カフェインの

代謝能を獲得させることができるか検討を試みた。まず初めに、ヒトのシトクローム P450 1A2 のトランスジェニックカイコ系統を樹立した。ウェスタンブロット解析により、トランスジェニックカイコでは、ヒトシトクローム P450 1A2 タンパク質の発現が検出された。このヒトシトクローム P450 1A2 発現カイコにおいてはカイコ血中におけるカフェインの消失が見られた (Figure 2)。また通常カイコで見られる高濃度のカフェイン投与によって引き起こされる体重増加の抑制が打ち消された (Figure 3)。以上の結果はトランスジェニックカイコにおいて、ヒトシトクローム P450 1A2 タンパク質が発現し、カフェインが代謝されるようになったことを示唆している。

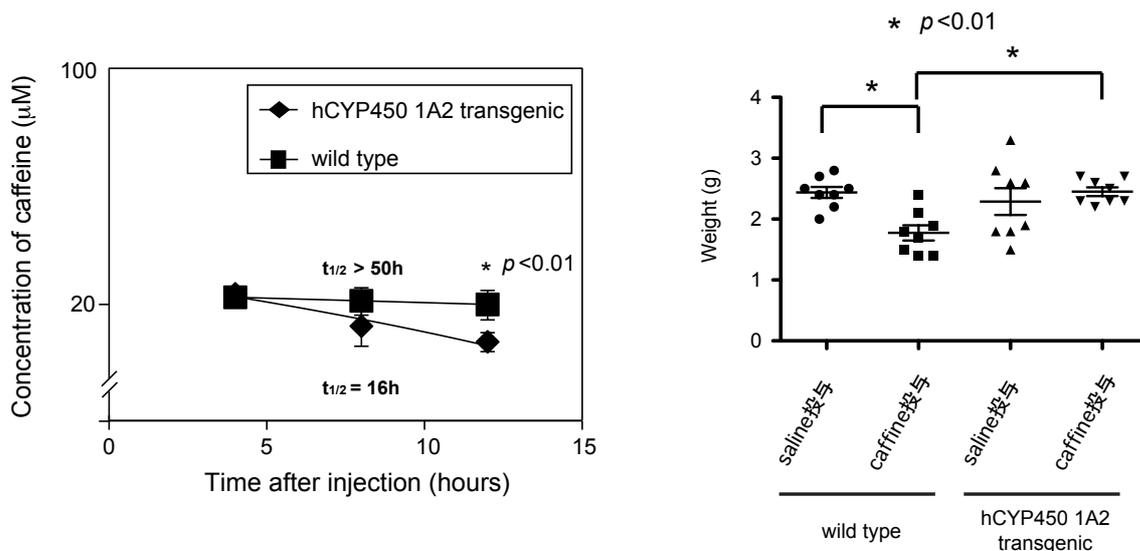


Figure 2 hCYP450 1A2 トランスジェニックカイコと野生型カイコにおける血中におけるカフェインの濃度推移の比較 Figure 3 hCYP450 1A2 トランスジェニックカイコにおけるカフェイン投与による体重増加抑制効果の消失

#### 体内動態が良好な化合物のスクリーニング方法の確立

セイヒの抽出物をカイコの腸管に注射し、経時間的に血液を採取し、HPLCによって分析した。その結果、セイヒ由来の腸管から吸収され、血液中に安定に存在する3種類の化合物が検出された。これらの化合物をそれぞれ精製し、構造を決定したところ、いずれもフラボノイド骨格を有する化合物であることが判った (Figure 3)。これらの化合物のカイコ血中半減期はいずれも 18 時間以上であった。また、これらの化合物は哺乳類の体内でも安定であることがすでに報告されていた。以上の結果は、カイコ体内での安定性を指標にして哺乳類の体内においても安定な化合物を探索できることを示唆している (2)。

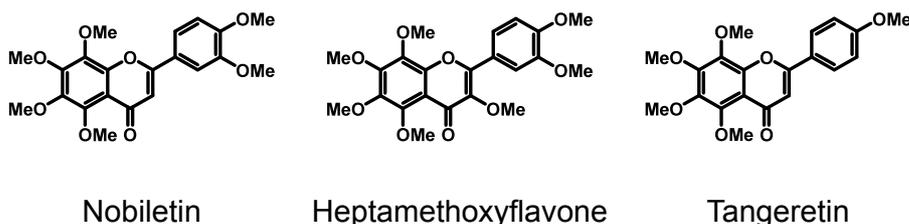


Figure 4 得られたフラボノイド骨格の化合物の構造

### <まとめと考察>

私は本研究でカイコはヒトと同様にシトクローム P450 による第 1 相の代謝反応及び、抱合反応による第 2 相の代謝反応を有していることを明らかにした。さらに私は、ヒトのシトクローム P450 の基質の多くがカイコにおいても代謝を受けることを明らかにした。ヒトと同様の機構の代謝反応を有することは、カイコを用いたモデルが薬物の治療効果を評価する系として有用であることを示唆している。また、本研究で確立したカイコ血液における安定性を指標とした化合物の探索方法により、哺乳類血液中で安定な化合物のライブラリーを構築することが可能になると考えられる。このライブラリーは治療効果を有する薬物の探索に有用であろう。さらに、本研究で初めて作出したヒト代謝酵素のトランスジェニックカイコは、哺乳類とカイコの薬物代謝能の差異を埋める手段として有効であると期待される。さらに、様々なヒト代謝酵素のトランスジェニックカイコを作出すれば、「ヒト型カイコ」として、哺乳類における薬効評価の前段階の探索系としてより有効なものとなると考えられる。

### <References>

- (1) Kushida A, Horie R, Hattori K, Hamamoto H, Sekimizu K, Tamura H.  
Xanthurenic acid is an endogenous substrate for the silkworm cytosolic sulfotransferase, bmST1.  
*J Insect Physiol.* 2012, 58(1):83-88.
- (2) Asami Y, Horie R, Hamamoto H, Sekimizu K  
Use of silkworms for identification of drug candidates having appropriate pharmacokinetics from plant sources. *BMC Pharmacol.* 2010, 11;10:7.
- (3) Hamamoto H, Tonoike A, Narushima K, Horie R, Sekimizu K.  
Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism.  
*Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2009, 149(3):334-339.